

M.H

PCT/JP 99/04122

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

30.07.99

REC'D 17 SEP 1999

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 8 年 7 月 3 1 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 2 3 0 2 0 4 号

出 願 人

Applicant (s):

旭化成工業株式会社

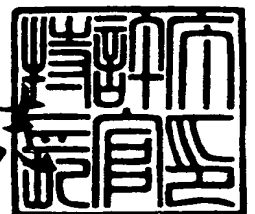
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1 9 9 9 年 8 月 1 9 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

伴 佐 山 建



出 証 番 号 出 証 特 平 1 1 - 3 0 5 8 0 3 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 X10-514

【提出日】 平成10年 7月31日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C07K16/12

【発明の名称】 微生物検出用抗体

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 松山 健二

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 白井 孝

【特許出願人】

    【識別番号】 000000033

    【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100090941

    【氏名又は名称】 藤野 清也

    【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 014834

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物検出用抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、当該微生物に特異的に反応する抗体。

【請求項 2】 微生物のリボソーム蛋白質が Ribosomal Protein L7/L12 である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 微生物のリボソーム蛋白質が Haemophilus influenzae のリボソーム蛋白質である請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】 微生物のリボソーム蛋白質が Neisseria gonorrhoeae のリボソーム蛋白質である請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 5】 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出方法。

【請求項 6】 各種の微生物について請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出法。

【請求項 7】 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。

【請求項 8】 各種の微生物について請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、種々の微生物特に細菌の検出に有用な抗体、それを用いた微生物検出方法および微生物検出用試薬キットに関する。

本発明は、医薬品工業、特に細菌を中心とする微生物感染症のための診断薬の製造に有効に利用される。

【0002】

【従来技術】

微生物感染症の診断は通常感染部位などでの原因菌の検出か、血清、体液中の

原因菌に対する抗体の検出により確定される。特に、この診断は原因菌の検出が患者への迅速な治療を可能にする意味で重要である。

感染症原因菌の検出には原因菌の分離培養を経て、その生化学的性状をもとに菌の同定を行う培養同定法、原因菌特異的遺伝子をもとにPCR法などにより増幅し検出する遺伝子診断法、原因菌の表面抗原マーカーとの抗体の特異反応を利用して原因菌検出を行う免疫的手法に大別できるが、培養同定法、遺伝子診断法は検出結果を得るまでに時間がかかり、短時間にしかも高感度に原因菌を検出し、迅速かつ適切な患者への治療につながる点で免疫法による診断が汎用されている。

### 【0003】

従来免疫法による感染症原因菌の診断には、菌種によって様々なマーカー抗原と抗体の組み合わせが使われている。

例えばクラミジア属の場合、属特異的抗原であるLPS（リポ多糖）の抗原決定基としての存在が知られており(Stephens,R.ら：J.Immunol., 128: 1083-89, 1982、Caldwell.M.D.:Inf.Immun.,44:306-14,1984)、様々な診断用キットにおいて特にChlamydia trachomatisの検出用試薬抗体に利用されている。

また、Chlamydia 属の外膜主要蛋白(MOMP;Major Outer Membrane Protein)に対するモノクローナル抗体について Ellena M. Peterson ら：Infection and Immunity,59(11),4147-4153, 1991 及びByron E.Batteiger ら：Infection and Immunity,53(3),530-533,1986 がそれぞれ報告している。

### 【0004】

特開昭63-298号公報は、約43キロダルトンのMycoplasma pneumoniaeの膜抗原蛋白に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法をベースとする免疫検出法が記載されている。

また、特開昭62-148859号公報（特公平 6-64065号公報）には、Haemophilus influenzaeの外膜蛋白に対するポリクローナル抗体の作製法と作製した抗体を用いた診断方法について記載されている。

英国特許出願 2172704号には、Neisseria gonorrhoeae株BS4 (NCTC 11922)の外膜小胞のコール酸ナトリウム抽出液から単離された約20キロダルトンの蛋白質

について記載されており、この物質を用いてハイブリドーマを調製することが開示されている。また、同じ N. gonorrhoeae についてカナダ特許出願 1220147号にはリポ多糖 (LPS) に対するモノクローナル抗体を用いる検出法について記載されている。

#### 【0005】

しかし、これらの抗体および検出法では、微生物に対する種特異性が十分ではなく、また同一種に存在する複数の表面抗原による血清型の全てをカバーし検出することが困難であるという問題点がある。

これらの従来の技術に用いられているマーカー抗原はかならずしも細菌細胞における同一成分（例えば、同一機能の蛋白質、LPSあるいは表面多糖成分）が細菌の進化の過程で菌種ごとに变化してきた分子をマーカーとして検出するというような統一的なものでなく、1つの分子を基準として菌種間で抗原性の差を検出しようという発想に基づいた免疫診断法はいまだに知られていない。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、理想的な微生物の検出・免疫診断法を可能とする統一マーカー抗原としてそれぞれの微生物について同一の分子に対する抗体、特に検出したい全ての微生物について細胞内の同一機能成分分子を用いてその進化の過程で変化が生じてきた部分に対する抗体、および該抗体を用いた種特異的かつほぼ全ての血清型をカバーできる微生物検出方法、微生物検出用試薬キットを提供しようとするものである。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは全ての微生物細胞に存在し、しかもそのアミノ酸構造が微生物間である程度の相違点をもつ細胞内分子、特にリボソーム蛋白質の一種である Ribosomal Protein L7/L12に着目した。Ribosomal Protein L7/L12は蛋白合成に必須なリボソーム蛋白としてその存在が知られている分子量約13キロダルトンの蛋白であり、特に大腸菌、枯草菌などいくつかの細菌でその全アミノ酸配列の解析が進んでおり、50%～65%程度のアミノ酸配列の相同性が確認されている。

## 【0008】

本発明者らはこの分子が細菌間で類似しているにもかかわらずその一部に各細菌固有の構造部分を持つことに着目し、該蛋白に対する抗体を利用することで様々な微生物、細菌の種特異的であつ全ての同一菌種内の血清型について検出が可能であることを見いだした。具体的には、例えばH.インフルエンザエ(Haemophilus influenzae) およびN.ゴノロエ(Neisseria gonorrhoeae)の2種についてその特異抗体を用いた微生物種の免疫法診断技術の開発を試みた結果、個々の微生物において該蛋白質特異的な抗体が取得でき、該抗体を用いることによりそれぞれの菌について種特異的な検出であるということを見いだしたことにより本発明を完成した。

## 【0009】

従って、本発明は、次のとおりの微生物検出用抗体、それを用いる微生物検出方法及び微生物検出用試薬キットに関する。

(1) 微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であつて、該微生物に特異的に反応する抗体、

(2) 微生物のリボソーム蛋白質がRibosomal Protein L7/L12である、前記(1)に記載の抗体、

(3) 微生物のリボソーム蛋白質が Haemophilus influenzae のリボソーム蛋白質である前記(1) または(2) に記載の抗体、

(4) 微生物のリボソーム蛋白質が Neisseria gonorrhoeae のリボソーム蛋白質である前記(1) または(2) に記載の抗体。

(5) 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いて検出を行なう微生物検出方法、

(6) 各種の微生物について前記(1) から(4) のいずれかの抗体を用いて検出を行なう微生物検出方法、

(7) 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いて構成された微生物検出用試薬キット。

(8) 各種の微生物について前記(1) から(4) のいずれかに記載の抗体を用いて構成された微生物検出用試薬キット。

## 【0010】

以下本発明について詳細に説明する。

配列表において配列番号1及び2はH.インフルエンザエのRibosomal Protein L7/L12遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号3及び4はH.ピロリのRibosomal Protein L7/L12遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号5及び6はN.ゴノロエのRibosomal Protein L7/L12遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号7、8はN.ゴノロエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得に用いたPCRのプライマーDNAである。配列番号9、10はH.インフルエンザエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得に用いたPCRのプライマーDNAである。配列番号11及び12はH.インフルエンザエから取得したRibosomal Protein L7/L12遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号13及び14はN.ゴノロエから取得したRibosomal Protein L7/L12遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列である。

なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端および右端はそれぞれアミノ基（以下、N末）およびカルボキシル基末端（以下、C末）であり、また塩基配列の左端および右端はそれぞれ5'末端および3'末端である。

また、本発明で述べられる遺伝子操作の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書の記載方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、例えばMolecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J.ら(1989)を挙げることができる。

## 【0011】

本発明において微生物は、細菌、酵母、カビ、放線菌、リケッチア類などの微生物類全般をさすが、特に微生物感染症の診断において問題となるのは細菌の場合が多い。

本発明において抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をさし、該蛋白質の全長あるいはその部分ペプチドを用いて作成することができる。抗体を作成するためのペプチドの長さは特に限定されないがRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体の場合、この蛋白質を特徴づけられる長さがあれば良く

、好ましくは6アミノ酸以上、特に好ましくは8アミノ酸以上のペプチドを用いれば良い。このペプチドあるいは全長蛋白質をそのまま、またはKLH(keyhole-limpet hemocyanin)やBSA(bovine serum albumin)といったキャリア蛋白質と架橋した後必要に応じてアジュバントとともに動物へ接種せしめ、その血清を回収することでRibosomal Protein L7/L12蛋白質を認識する抗体(ポリクローナル抗体)を含む抗血清を得ることができる。また抗血清より抗体を精製して使用することもできる。接種する動物としてはヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギなどが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合はマウスが好ましい。また該蛋白質の全長または6残基以上、望ましくは8残基以上のアミノ酸配列をGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)などと融合させたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書(Antibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory)に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組み換え抗体によっても作製することができる。

#### 【0012】

本発明のマーカー抗原として用いることができるRibosomal Protein L7/L12に対する抗体は、以下の3つの方法あるいはその他の類似の方法によって取得することができる。

a) Ribosomal Protein L7/L12の遺伝子配列およびアミノ酸配列が既知の微生物については、他の微生物の該蛋白のアミノ酸配列との類似性の少ない領域についてアミノ酸数5個から30個ほどのペプチド断片を合成し、それを免疫原としてポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体を作製することにより目的の抗体を取得することができる。

また、既知の該遺伝子の両端部位のDNA配列をプローブとしたPCR手法による遺伝子増幅、相同部分配列を鋳型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該遺伝子の全長配列を取得することができる。



## 【0013】

そのその他の蛋白遺伝子とのフュージョン遺伝子などを構築し、大腸菌等を宿主として公知の遺伝子導入手法により宿主内に該当フュージョン遺伝子を挿入し大量に発現させた後にフュージョン蛋白として用いた蛋白質に対する抗体アフィニティーカラム法などにより発現蛋白を精製することにより目的蛋白抗原を取得することができる。この場合Ribosomal Protein L7/L12の全長蛋白が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原にたいしては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

## 【0014】

b) Ribosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列が未知の微生物については1つにはRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列が菌種間で50～60%相同であることより、そのアミノ酸配列の相同部分の配列を基にしてPCR法による特定配列部分の遺伝子増幅や相同部分配列を鋳型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該蛋白遺伝子を容易に取得することができる。

そのその他の蛋白遺伝子とのフュージョン遺伝子などを構築し、大腸菌等を宿主として公知の遺伝子導入手法により宿主内に該フュージョン遺伝子を挿入し大量に発現させたのちにフュージョン蛋白として用いた蛋白質に対する抗体アフィニティーカラム法などにより発現蛋白を精製することにより目的蛋白抗原を取得することができる。この場合Ribosomal Protein L7/L12の全長蛋白が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

## 【0015】

c) あるいはRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列が未知な場合の別な方法として、既知のRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列のうち細菌間で保存されている共通配列部分に相当する5～30アミノ酸の合成ペプチドを作製し、そのペプチド配列に対し公知の方法でポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトによって目的の微生物細胞破碎液を精製することにより高度に精製されたRibosomal Protein L7/L12蛋白を取得することができる。

蛋白の精製度が不足している場合は公知の精製手法であるイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過などの手法により精製したのち作製した抗体によるウェスタンブロットなどの方法によりRibosomal Protein L7/L12の溶出フラクションを同定し精製画分を得ることができる。得られた精製Ribosomal Protein L7/L12抗原を基にして公知の方法によりハイブリドーマを取得しb)と同様に目的の微生物に特異的に反応するハイブリドーマを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

#### 【0016】

前記a)～c)などの方法によって取得した本発明における各種微生物特異的な抗体はたとえばポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに補足抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用することにより種々の目的の微生物に特異的な検出用試薬キットを提供することができる。

抗体を用いる微生物検出方法とは、たとえばポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに補足抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなどの既知の免疫測定手法を利用する検出方法に相当する。

#### 【0017】

また該検出方法において必要となる微生物からの細胞内マーカー抗原の抽出方法としては、TritonX-100,Tween-20をはじめとする種々の界面活性剤を用いた抽出試薬による処理法、適当なプロテアーゼなどの酵素を用いる酵素処理法、物理的方法による微生物細胞の破碎をはじめ既知の細胞構造の破碎手法が用いられうるが、界面活性剤等の組み合わせにより微生物ごとに試薬による最適な抽出条件を設定することが望ましい。

## 【0018】

また、本発明における、抗体を用いる微生物検出用試薬キットとは、当該検出方法を用いた検出用試薬キットに相当する。

例えば、肺炎、気管支炎、髄膜炎などの原因菌として診断意義の高い H. influenzae の特異的抗体を取得する場合本細菌のRibosomal Protein L7/L12蛋白のアミノ酸配列及びDNA配列はデータベース等の記載により公知である。Haemophilus influenzae のRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列及びDNA配列を配列表配列番号：1及び2に示す。

## 【0019】

従って本菌の場合同様にRibosomal Protein L7/L12蛋白のアミノ酸配列が公知である、例えば配列表配列番号：3及び4に示す Helicobacter pylori の同蛋白などとのアミノ酸配列を比較しその相同性の低い部分について5～30アミノ酸の合成ペプチドを合成しそのペプチドにたいする H. influenzae 特異的なポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製することができる。

特にポリクローナル抗体の場合、免疫した動物の抗血清をprotein Aカラム等で精製しIgG画分を取得したのち、さらに動物の免疫に用いた合成ペプチドによるアフィニティー精製を実施することが望ましい。

## 【0020】

さらに、H. influenzae の遺伝子の全長を取得し、他の蛋白質とのフュージョン蛋白として大腸菌に大量生産させ精製後、そのフュージョン蛋白抗原により公知の手法により複数のハイブリドーマ株を確立しその生産した抗体の評価をすることにより目的の該細菌特異的モノクローナル抗体を取得することも可能である。

またたとえば淋病の原因菌でありSTD（性行為感染症）の代表的な原因菌としてその診断意義が認知されている Neisseria gonorrhoeae の場合、Ribosomal Protein L7/L12蛋白質のDNA、アミノ酸配列は最近米国オクラホマ大学で淋菌genomeプロジェクトにおいて決定され、該細菌中のDNA配列がインターネット上で公開されている。

公知のRibosomal Protein L7/L12蛋白質のDNA配列の一部配列を用いて類似配列DNA断片の有無を検索したところRibosomal Protein L7/L12遺伝子に該当するDNA配列が存在し、その全DNA配列情報を取得できた。この淋菌のRibosomal Protein L7/L12遺伝子の全塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列表配列番号：5及び6に示す。

#### 【0021】

該当するDNA配列の例えば配列表配列番号7、配列表配列番号：8に示す様なN末端、C末端部分の配列をもとにしたPCRのプライマーを設計しその配列の相同性を利用して、公知の方法に従って N. gonorrhoeae の培養菌体より抽出した細菌genomeDNAを材料としてPCR法などにより増幅してくるDNA断片を取得しその断片のDNAシーケンス情報を解析することにより蛋白質の全長遺伝子配列を取得することができた。

#### 【0022】

取得した淋菌のRibosomal Protein L7/L12遺伝子はたとえばGST（グルタチオンエストランスフェラーゼ）などとフュージョン蛋白遺伝子を構成し適当な発現用プラスミドを用いて発現ベクターを構築後、大腸菌を形質転換して該蛋白質を大量発現させうる。形質転換した大腸菌を適当量培養し、回収した菌体の破砕液をGST抗体を用いたアフィニティーカラムでクロマト精製することにより、淋菌のRibosomal Protein L7/L12蛋白質とGSTのフュージョン蛋白質の精製物が得られる。

この抗原蛋白を用いて公知の手法によりハイブリドーマを取得し、さらに淋菌特異的な反応を示す抗体を選択することより目的の抗体を取得できる。

本発明に基づき作製された抗体は、公知の測定手法であるポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公

知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに補足抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用できる。

#### 【0023】

また本発明に基づき作製された抗体は全ての免疫測定手法において当該抗原蛋白質を固相あるいは液相中で捕獲するいわゆるcapture抗体として機能しうると同時にパーオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を公知の方法により修飾することによりいわゆる酵素標識抗体としても機能しうる。

#### 【0024】

##### 【発明の実施の形態】

以下の例は本発明を具体的に説明するためのものであって本発明について何らその範囲を限定するものではない。

##### 【実施例1】

Haemophilus influenzae からのRibosomal Protein L7/L12遺伝子のクローニング

H. influenzae ATCC9334(IID984) 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適量植菌したのち、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で37℃、CO<sub>2</sub> 0.5 %条件で24時間培養する。生育したコロニーを最終的に5×10<sup>9</sup>CFU/ml 前後になるようにTE Bufferに懸濁する。このうち約1.5ml を微量遠心チューブに移し取り10000rpmで2分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を567μl のTEバッファーに再懸濁する。さらに30μl の10%SDSと3μl の20mg/ml Proteinase K溶液を加えて良く混合し、37℃で1時間インキュベートする。次に10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl溶液を80μl追添し、よく混合したのち65℃で10分間インキュベートする。次に、体積比24/1のクロロホルム- イソアミルアルコール混合液を700μl 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で12000rpm、5分間（4℃コントロール下）遠心処理したのち、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに0.6倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振ってDNAの沈殿を形成する。白いDNA沈殿をガラス棒ですくっ

て1mlの70%エタノール（-20℃冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

#### 【0025】

次に 10000rpm で5分間遠心処理し、上澄みを静かに除去したのちさらに1mlの70%エタノールを加えてふたたび5分間遠心する。ふたたび上澄みを除去したのち沈殿を 100  $\mu$ l のTEバッファーに溶解しDNA溶液を得た。このゲノムDNA 溶液の濃度をMolecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory PressのE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。

このゲノムDNAのうち10ngを用いて PCR(polymerase chain reaction)を行った。PCRはTaqポリメラーゼ（宝酒造社製、コードR001A）を用いた。酵素に添付のバッファーを5  $\mu$ l、酵素に添付のdNTP mixture 4  $\mu$ lと配列表配列番号：9に示した合成オリゴヌクレオチドAおよび、配列表配列番号：10に示した合成オリゴヌクレオチドBをそれぞれ 200pmolを加え、最終容量50  $\mu$ lとした。

#### 【0026】

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、95℃ 1分、50℃ 2分、72℃ 3分を5サイクル行ったのち、95℃ 1分、60℃ 2分、72℃ 3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約400bpのcDNAが増幅されていることを確認した。さらに制限酵素BamHIおよびXhoIで切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動をおこないエチジウムブロマイド染色後約370bpのバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、市販のベクターであるpGEX-4T-1（Pharmacia 製）に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことによりGST蛋白とのフュージョン蛋白を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。

具体的には、ベクター pGEX-4T-1と先のDNAとをそのモル比が1：3となるように混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）にてベクターにD

NAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクター pGEX-4T-1を大腸菌One Shot Competent Cells (Invitrogen社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma 社製) を  $50 \mu\text{g/ml}$  含むL-Broth(宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度  $37^\circ\text{C}$  に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth 液体培地  $2\text{ml}$  に植え付け、8時間程度  $37^\circ\text{C}$  で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約  $370\text{bp}$  のDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行った。

#### 【0027】

挿入DNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製はPRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製) を用いて行なった。 $0.5\text{ml}$  容のマイクロチューブに  $9.5 \mu\text{l}$  の反応ストック液、 $4.0 \mu\text{l}$  の  $0.8\text{pmol}/\mu\text{l}$  の (T7プロモータープライマー) (GIBCO BRL 社製) および  $6.5 \mu\text{l}$  の  $0.16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  のシーケンス用鋳型DNAを加えて混合し、 $100 \mu\text{l}$  のミネラルオイルを重層後、 $96^\circ\text{C}$  30秒、 $55^\circ\text{C}$  15秒および  $60^\circ\text{C}$  4分を1サイクルとするPCR増幅反応を25サイクル行ない、 $4^\circ\text{C}$  で5分間保温した。反応後、 $80 \mu\text{l}$  の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を3回のフェノール・クロロホルム抽出を行なった。 $100 \mu\text{l}$  の水層に  $10\text{ml}$  の  $3\text{M}$  酢酸ナトリウム ( $\text{pH} 5.2$ ) および  $300 \mu\text{l}$  のエタノールを加えて攪拌後、室温、 $14,000\text{rpm}$  にて15分間の遠心を行ない沈殿を回収した。沈殿を  $75\%$  エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、 $4 \mu\text{l}$  の  $10\text{mM}$  のEDTAを含むホルムアミドに溶解して  $90^\circ\text{C}$ 、2分間で変性後、氷中で冷却してシーケンスに供した。

得られた5個のクローンの内1個の配列にPCRに用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の細菌、例えば H. influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似したDNA配列が見い出された。その構造遺伝子部分の

全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：11及び12のような配列であった。この遺伝子断片は、明らかにHaemophilus influenzaeのRibosomal Protein L7/L12蛋白質の遺伝子をコードするものである。

【0028】

【実施例2】

Haemophilus influenzae からのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の大腸菌での大量発現と精製

発現ベクターを組み込んだ大腸菌をLB中で50ml 37℃、オーバーナイトで培養した。2倍濃度のTY培地 500mlを37℃で1時間あたためておいた。1晩培養した大腸菌液50mlを500mlの前述の培地に入れた。1時間後、100mM IPTG 550μl 入れ4時間培養後回収し、250ml ずつ遠心チューブにいれて 7000rpm、10分間遠心した。上澄みを棄てて50mM TrisHCl pH7.4、25% Sucroseを含むLysis バッファー25mlずつに溶解した。

さらに、10% NP-40 1.25ml、1M MgCl<sub>2</sub> 125μl を加えてプラスティックチューブに移した。1分間×5回氷冷中でsonicationを実施し、12000rpm、15分間遠心後上澄みを回収した。

【0029】

次に、PBSでコンディショニングしたグルタチオン（GST）アガロースカラムに前記の上澄み液を吸着させた。

次に、20mM Tris バッファー pH7.4、4.2mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTTを含む洗浄液でカラムを2ベッドボリューム分洗浄した。その後5mM のグルタチオンを含む50mM Tris バッファーpH9.6 で溶出し、分画したフラクション中の蛋白含有量を色素結合法（ブラッドフォード法；Biorad社）で検出し、メインフラクションを取得した。得られた精製Ribosomal Protein L7/L12/ GST Hフュージョン蛋白の純度は電気泳動法により確認したところ約75%であり免疫源として十分な純度を確保できた。

【0030】

【実施例3】

Haemophilus influenzae のRibosomal Protein L7/L12の蛋白質に対するモノ



## クローナル抗体の作製

まずマウスの免疫については Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12/ GST のフュージョン蛋白抗原  $100\mu\text{g}$  を  $200\mu\text{l}$  の PBS に溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを  $200\mu\text{l}$  加え混合、エマルジョン化したのち  $200\mu\text{l}$  を腹腔内に注射した。

さらに、2週間後、4週間後、6週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに10週間後、14週間後に2倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から3日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

## 【0031】

無菌的に取り出したマウスの脾細胞  $10^8$  個に対し骨髓腫細胞  $2 \times 10^7$  個をガラスチューブに取り良く混合したのち  $1500\text{rpm}$  で5分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髓腫細胞は、NS-1系の細胞株を用い10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地で培養し、細胞融合の2週間前から  $0.13\text{mM}$  のアザグアニン、 $0.5\mu\text{g/ml}$  の MC-210、10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地で1週間培養後、さらに10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地で1週間培養したものをを用いた。混合した細胞サンプルに  $37^\circ\text{C}$  に保温した  $50\text{ml}$  のRPMI1640培地を  $30\text{ml}$  加え  $1500\text{rpm}$  で遠心、上澄み除去後  $37^\circ\text{C}$  に保温した50%ポリエチレングリコールを  $1\text{ml}$  加え激しく攪拌しながら2分間処理後、 $37^\circ\text{C}$  に保温した  $10\text{ml}$  のRPMI1640培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約5分間激しく攪拌混合した。

## 【0032】

$1000\text{rpm}$  で5分間遠心、上澄み除去後さらに  $30\text{ml}$  のHAT培地を加え細胞濃度が  $5 \times 10^6$  個/ $\text{ml}$  になるように調整し攪拌均一化後、96穴プレート型培養プレートに  $0.1\text{ml}$  ずつ分注し7%炭酸ガス条件下、 $37^\circ\text{C}$  で培養し、1日目、1週間目、2週間目にHAT培地を  $0.1\text{ml}$  ずつ加えた。

## 【0033】

次に目的の抗体を生産している細胞をスクリーニングするためにELISA法による評価を実施した。 $0.05\%$  のアジ化ソーダ含むPBS中に溶解した Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12/GST蛋白および GSH蛋白をそれぞれ  $10\mu$

g/ml濃度で希釈した液を 100  $\mu$ l ずつ96穴プレートの別々に分注し4℃で1晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS中)200  $\mu$ l 添加し室温で1時間反応してブロッキングした。上澄み除去後洗浄液(tween200.02%、PBS)で洗浄し、その上に融合細胞の培養液 100  $\mu$ l を加え室温で2時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した。これに、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG 抗体液を 100  $\mu$ l 加え室温、1時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄したのちTMB溶液(KPL社)を 100  $\mu$ l ずつ加え室温で20分反応、発色後1Nの硫酸を 100  $\mu$ l 添加して反応を停止し、450nmの吸光を測定した。

この結果、Ribosomal Protein L7/L12/GST蛋白にのみ反応しGSTには反応しない陽性ウェルが見いだされRibosomal Protein L7/L12蛋白に対する抗体が含まれていることが判明した。

#### 【0034】

そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し24穴プラスチックプレート中、HAT 培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約20個/ml になるようにHT培地で希釈し50  $\mu$ l を、HT培地に懸濁した6週齢のマウス胸腺細胞  $10^6$ 個と96穴培養プレート中で混合後、7%炭酸ガス条件下、37℃で2週間培養した。培養上澄み中の抗体活性を前述のELISA法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12蛋白との反応陽性の細胞を回収した。

さらに、同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマ HIR B-1 ～5 の計5クローンを取得した。

#### 【0035】

#### 【実施例4】

Haemophilus influenzae のRibosomal Protein L7/L12蛋白と反応するモノクローナル抗体の淋菌および他の細菌との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的にはRPMI1640培地(10% FCS入り)を用いて継代培養した細胞をあらかじめ2週間前に0.5ml のプリスタンを腹腔内に注射したBalb/Cマウスの腹腔内に

$5 \times 10^6$  個 (PBS中) 注射し、3 週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。

取得した抗体含有液をProteinAカラム (5 mlベッド, Pharmacia社) に吸着させ、PBSで3ベッドボリューム洗浄し、pH 3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。

#### 【0036】

この5株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いてELISA 法により評価した。

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより検出反応用抗体として使用した。

すなわち酵素標識は、ホースラディッシュパーオキシダーゼ (Sigma グレード VI) を用い結合には試薬S-アセチルチオ酢酸N- ヒドロキシスクシンイミドを使用しAnalytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては0.05%のアジ化ソーダ含む PBS中に溶解した市販の抗Haemophilus influenzaeポリクローナル抗体 (Biodesign 社、ウサギ) を  $10 \mu\text{g/ml}$  濃度で希釈した液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ96穴プレートの別々に分注し  $4^\circ\text{C}$  で1晩吸着させた。

#### 【0037】

上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液 (PBS中)  $200 \mu\text{l}$  添加し室温で1時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液 (tween20 0.02%、PBS) で洗浄し、その上に各種細菌の培養液にトリトンX-100 を0.3 %濃度加え室温で5分間抽出操作をほどこした抗原液を  $100 \mu\text{l}$  を加え室温で2時間反応後上澄みを除去し、さらに洗浄液で洗浄後、 $5 \mu\text{g/ml}$  の各ペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protein L7/L12 抗体液を  $100 \mu\text{l}$  加え室温、1時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄したのち TMB溶液 (KPL社) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え室温で20分反応、発色後1Nの硫酸を  $100 \mu\text{l}$  添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

## 【0038】

その結果、表1に示すように酵素標識抗体としてハイブリドーマHIRB-2由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験した Haemophilus influenzae の全ての株を $10^6$  個/ml の感度で検出すると同時に他の Neisseria 属細菌やその他の細菌について $10^8$  個/ml の高濃度でも反応性を示さずRibosomal Protein L7/L12蛋白に対するモノクローナル抗体を用いることで Haemophilus influenzae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

## 【0039】

【表1】

	10 <sup>6</sup> 個/ml検出結果
H. influenzae ATCC9327	+
H. influenzae ATCC9334	+
H. influenzae ATCC9007	+
H. influenzae ATCC9332	+
H. influenzae ATCC8142	+
H. influenzae ATCC9833	+
	10 <sup>8</sup> 個/ml検出結果
N. meningitides	-
N. lactamica	-
N. mucosa	-
N. sicca	-
B. catarrharis	-
N. gonorrhoeae	-
E. coli	-

K.pneumoniae

—

【0040】

## 【実施例5】

N. gonorrhoeae からのRibosomal Protein L7/L12遺伝子のクローニング、同蛋白の大腸菌での大量発現、精製および同蛋白の対するモノクローナル抗体の作製。

N. gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適量植菌したのち、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で37℃、CO<sub>2</sub> 0.5%条件で24時間培養した。生育したコロニーを最終的に  $5 \times 10^9$  CFU/ml前後になるようにTE Bufferに懸濁する。そのうち約 1.5mlを微量遠心チューブに移し取り10000rpmで2分間遠心し、上澄みを棄てた。沈殿部分を 567  $\mu$ l のTEバッファーに再懸濁した。さらに、30  $\mu$ l の10% SDSと 3  $\mu$ l の20mg/ml Proteinase K溶液を加えて良く混合し、37℃で1時間インキュベートした。

次に10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl溶液を80  $\mu$ l追加しよく混合したのち65℃で10分間インキュベートした。次に、体積比24/1のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700  $\mu$ l 加えよく攪拌した。この溶液を微量遠心機で12000rpm、5分間（4℃コントロール下）遠心処理したのち、水層画分を新しい微量遠心管に移した。そこに0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよくふってDNA の沈殿を形成した。白いDNA 沈殿をガラス棒ですくって1mlの70%エタノール（-20℃に冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移した。

【0041】

次に、10000rpmで5分間遠心処理し、上澄みを静かに除去したのちさらに1mlの70%エタノールを加えて再び5分間遠心した。再び上澄みを除去したのち沈殿を 100  $\mu$ l のTEバッファーに溶解しDNA溶液を得た。このゲノムDNA溶液の濃度をMolecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory PressのE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。

このゲノムDNAのうち10ngを用いてPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRはTaq ポリメラーゼ (宝酒造社製、コードR00 1A) を用いた。酵素に添付のバッファーを  $5\mu\text{l}$ 、酵素に添付のdNTP mixture  $4\mu\text{l}$  と Haemophilus influenzaeなどの菌のRibosomal Protein L7/L12DNA配列との類似性によりインターネット情報 (オクラホマ大、淋菌genomeプロジェクト公開genome DNA情報) より取得した N. gonorrhoeae のRibosomal Protein L7/L12DNA配列をもとに設計した配列表配列番号: 7に示した合成オリゴヌクレオチドCおよび、配列表配列番号: 8に示した合成オリゴヌクレオチドDをプローブとしてそれぞれ  $200\text{ pmol}$ を加え、最終容量 $50\mu\text{l}$ とした。

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、 $95^{\circ}\text{C}$  1分、 $50^{\circ}\text{C}$  2分、 $72^{\circ}\text{C}$  3分を5サイクル行ったのち、 $95^{\circ}\text{C}$  1分、 $60^{\circ}\text{C}$  2分、 $72^{\circ}\text{C}$  3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (日本ジーン社製) にて染色後、紫外線下で観察し、約400bpのcDNAが増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI およびXhoIで切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行ないエチジウムブロマイド染色後約370bpのバンドをゲルから切り出して Suprec01 (宝酒造社製) で精製後、市販のベクターである pGEX-4T-1 (Pharmacia製) に組み込んだ。

具体的にはベクターpGEX-4T-1と先のDNAとをそのモル比が1:3となるように混ぜ合わせて、T4DNAリガーゼ (Invitrogen社製) にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクターpGEX-4T-1を大腸菌One Shot Competent Cells (Invitrogen社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma社製) を $50\mu\text{g/ml}$ 含むL-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度 $37^{\circ}\text{C}$ に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地  $2\text{ml}$ に植え付け、8時間程度 $37^{\circ}\text{C}$ で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素BamHI/XhoIにて消化して、約370bpのDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行った。

## 【0042】

挿入DNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製はPRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いて行なった。0.5ml容のマイクロチューブに9.5 $\mu$ lの反応ストック液、4.0 $\mu$ lの0.8pmol/ $\mu$ lの(T7プロモータープライマー)(GIBCO BRL社製)および6.5 $\mu$ lの0.16 $\mu$ g/ $\mu$ lのシーケンス用鋳型DNAを加えて混合し、100 $\mu$ lのミネラルオイルを重層後、96℃30秒、55℃15秒および60℃4分を1サイクルとするPCR増幅反応を25サイクル行ない、4℃で5分間保温した。反応後、80 $\mu$ lの滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を3回のフェノール・クロロホルム抽出を行なった。100 $\mu$ lの水層に10 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)および300 $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌後、室温、14,000rpmにて15分間の遠心を行ない沈殿を回収した。沈殿を75%エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、4 $\mu$ lの10mMのEDTAを含むホルムアミドに溶解して90℃、2分間で変性後、氷中で冷却してシーケンスに供した。得られた5個のクローンの内1個の配列にPCRに用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の細菌例えば H. influenzae の Ribosomal Protein L7/L12遺伝子配列と非常に類似したDNA配列が見いだされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号:13及び14に示すような配列であった。この遺伝子断片は明らかに N. gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質の遺伝子をコードするものである。

このように構築した N. gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12/GSTフュージョン蛋白発現ベクターを用いて実施例2に記載の方法と同様の方法により精製した N. gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12/GSTフュージョン蛋白質を取得した。

さらに、実施例3記載の方法に従い N. gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12蛋白に対するモノクローナル抗体に生産するハイブリドーマGCRB-3株を取得した。

## 【0043】

## 【実施例 6】

N. gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白と反応するモノクローナル抗体の淋菌および他の細菌との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞 GCRB-3 を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には、RPMI1640 培地 (10% FCS 入り) を用いて継代培養した細胞をあらかじめ 2 週間前に 0.5ml の プリスタン を腹腔内に注射した Balb/C マウスの腹腔内に  $5 \times 10^6$  個 (PBS 中) 注射し、3 週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。取得した抗体含有液を Protein A カラム (5 ml ベッド, Pharmacia 社) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH 3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。この 5 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いて ELISA 法により評価した。

## 【0044】

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより検出反応用抗体として使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ (Sigma グレード VI) を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry 132 (1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては 0.05% のアジ化ソーダを含む PBS 中に溶解した市販の抗淋菌ポリクローナル抗体 (ヴァイロスタット社、ウサギ) を  $10 \mu\text{g/ml}$  濃度で希釈した液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ 96 穴プレートの別々に分注し  $4^\circ\text{C}$  で 1 晩吸着させた。

## 【0045】

上澄み除去後、1% 牛血清アルブミン溶液 (PBS 中)  $200 \mu\text{l}$  添加し室温で 1 時間反応しブロッキングした。上澄み除去後洗浄液 (Tween 20 0.02%、PBS) で洗浄し、その上に各種細菌の培養液にトリトン X-100 を 0.3% 濃度加え室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を  $100 \mu\text{l}$  を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、 $5 \mu\text{g/ml}$  の各ペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protei



n L7/L12抗体液を  $100\mu\text{l}$  加え室温、1時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄したのちTMB溶液(KPL社)を  $100\mu\text{l}$  ずつ加え室温で20分反応、発色後1Nの硫酸を  $100\mu\text{l}$  添加して反応を停止し、450nmの吸光を測定した。

## 【0046】

その結果、表2に示すように酵素標識抗体としてハイブリドーマGCRB-2由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験した淋菌の全ての株を  $10^6$ 個/mlの感度で検出すると同時に他のNeisseria 属細菌やその他の細菌について  $10^8$ 個/mlの高濃度でも反応性を示さずRibosomal Protein L7/L12蛋白に対するモノクローナル抗体を用いることでN. gonorrhoeae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

## 【0047】

【表2】

$10^6$ 個/ml 検出結果	
N.gonorrhoeae ATCC9793	+
N.gonorrhoeae ATCC19424	+
N.gonorrhoeae ATCC27628	+
N.gonorrhoeae ATCC27629	+
N.gonorrhoeae ATCC27630	+
N.gonorrhoeae ATCC27631	+
N.gonorrhoeae ATCC27632	+
N.gonorrhoeae ATCC27633	+
N.gonorrhoeae ATCC35541	+
N.gonorrhoeae ATCC35542	+
N.gonorrhoeae ATCC43069	+
N.gonorrhoeae ATCC43070	+
N.gonorrhoeae ATCC49226	+

---

 $10^8$ 個/ml 検出結果
 

---

N.meningitides	—
N.lactamica	—
N.mucosa	—
N.sicca	—
B.catarrharis	—
H.influenzae	—
E.coli	—
K.pneumoniae	—

---

【0048】

## 【発明の効果】

本発明によると各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いて微生物の検出を行なうことで微生物を種特異的になおかつ同一種内の全ての血清型の微生物を精度よく検出することができる。

このような抗体として微生物のリボソーム蛋白質、特に Ribosomal protein L 7/L12 に対する抗体を用い、H. influenzaeや N. gorrhoeae の検出を行なうことができる。

また、このような抗体を構成要素とする微生物検出用試薬キットを用いることで、微生物の検出をより汎用的に精度良く行なうことができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 旭化成工業株式会社 (ASAHIKASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)

<120> 微生物検出用抗体

<130> X10-514

<160> 14

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 1

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35 40 45

gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca 192

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50 55 60

ggt gcg aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt 240

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly  
 65 70 75 80  
 tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac 288  
 Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn  
 85 90 95  
 tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa 336  
 Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu  
 100 105 110  
 tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa 369  
 Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys  
 115 120

< 2 1 0 > 2  
 < 2 1 1 > 1 2 3  
 < 2 1 2 > PRT  
 < 2 1 3 > Haemophilus influenzae

< 4 0 0 > 2  
 Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

	85	90	95
Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu			
100	105	110	
Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys			
115	120		

<210> 3  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Helicobacter pylori

<400> 3

atg gca att tca aaa gaa gaa gtg tta gag tat att ggt tca ttg agc	48
Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser	
1 5 10 15	
gtt tta gag ctt tct gaa ttg gtt aaa atg ttt gag gaa aaa ttt ggc	96
Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly	
20 25 30	
gtg agc gcg act cca acg gtc gta gcg ggt gcg gct gta gct ggc ggt	144
Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly	
35 40 45	
gca gcg gct gag agc gaa gaa aaa acc gaa ttt aat gtg att ttg gcc	192
Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala	
50 55 60	
gat agc ggt gct gaa aaa att aag gtg att aaa gtg gtt cgt gaa atc	240
Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile	
65 70 75 80	
act gga ctt ggc ctg aaa gaa gct aaa gac gct acc gaa aaa acc cct	288
Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro	

	85	90	95	
cat gtg ctt aaa gag ggc gtg aat aaa gaa gaa gct gaa acc atc aag				336
His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys				
	100	105	110	
aag aaa ctt gaa gaa gta ggc gct aag gtt gaa gtc aag				375
Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys				
	115	120	125	

< 2 1 0 > 4  
 < 2 1 1 > 1 2 5  
 < 2 1 2 > PRT  
 < 2 1 3 > Helicobacter pylori

< 4 0 0 > 4

Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser				
1	5	10	15	
Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly				
	20	25	30	
Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly				
	35	40	45	
Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala				
	50	55	60	
Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile				
	65	70	75	80
Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro				
	85	90	95	
His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys				
	100	105	110	
Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys				

115

120

125

<210> 5

<211> 369

<212> DNA

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 5

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc 48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1 5 10 15

gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35 40 45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc 192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50 55 60

ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65 70 75 80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85 90 95

att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa 336

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100 105 110

ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa

369

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 1 2 3

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > *Neisseria gonorrhoeae*

< 4 0 0 > 6

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65

70

75

80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85

90

95

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 3 1



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N.ゴノロエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得に用いた  
PCR のプライマー DNA。

<400> 7

gtaaggatcc atggctatta ctaaagaaga c 31

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N.ゴノロエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得に用いた  
PCR のプライマー DNA。

<400> 8

agcatctcga gatttgattt cgactttagc gcct 34

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H.インフルエンザエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得

に用いた PCRのプライマー DNA。

<400> 9

gtaaggatcc atgtcattaa ctaacgaaca a 31

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H.インフルエンザエからのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得  
に用いた PCRのプライマー DNA。

<400> 10

agcatctcga gatttaactt ctacttctgc accc 34

<210> 11

<211> 369

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 11

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca	144
Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala	
35 40 45	
gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca	192
Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala	
50 55 60	
ggt gcg aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt	240
Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly	
65 70 75 80	
tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac	288
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn	
85 90 95	
tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa	336
Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu	
100 105 110	
tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa	369
Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys	
115 120	

<210> 12  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 12  
 Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly  
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn  
 85 90 95  
 Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu  
 100 105 110  
 Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys  
 115 120

<210> 13  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 13  
 atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc 48  
 Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr  
 1 5 10 15  
 gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt 96  
 Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly  
 20 25 30  
 gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct 144  
 Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc 192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala  
 50 55 60  
 ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240  
 Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly  
 65 70 75 80  
 ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288  
 Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr  
 85 90 95  
 att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa 336  
 Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln  
 100 105 110  
 ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa 369  
 Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys  
 115 120

<210> 14  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 14  
 Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala  
 50 55 60

Gly	Asp	Gln	Lys	Val	Gly	Val	Ile	Lys	Val	Val	Arg	Ala	Ile	Thr	Gly
65					70					75					80
Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Ala	Pro	Lys	Thr
				85					90					95	
Ile	Lys	Glu	Gly	Val	Ser	Lys	Ala	Glu	Ala	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Gln
				100				105					110		
Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				115				120							

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 種特異的であり、かつ同一種内の全ての血清型を検出できる微生物検出用抗体、微生物検出方法、微生物検出用試薬キットを提供する。

【解決手段】 各種の微生物について細胞内の同一機能分子、特にリボソーム蛋白質、とりわけリボソーム蛋白質 Ribosomal Protein L7/L12に対する抗体を作製し、対象微生物に特異的に反応する抗体を選択する。この抗体を用いて微生物を検出する。

医薬品工業、特に細菌を中心とする微生物感染症のための診断薬として有用である。

【選択図】 選択図なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000033

【住所又は居所】

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

【氏名又は名称】

旭化成工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100090941

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野特許事務所

【氏名又は名称】

藤野 清也



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
氏 名 旭化成工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**